

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Zürich
(Direktor: Prof. Dr. W. Löffler)
Arbeit unter Leitung von Dr. A. F. Essellier, Oberarzt

Zur Frage der Beeinflussung des ACTH-Eosinophilentests durch Heparin

INAUGURAL-DISSERTATION

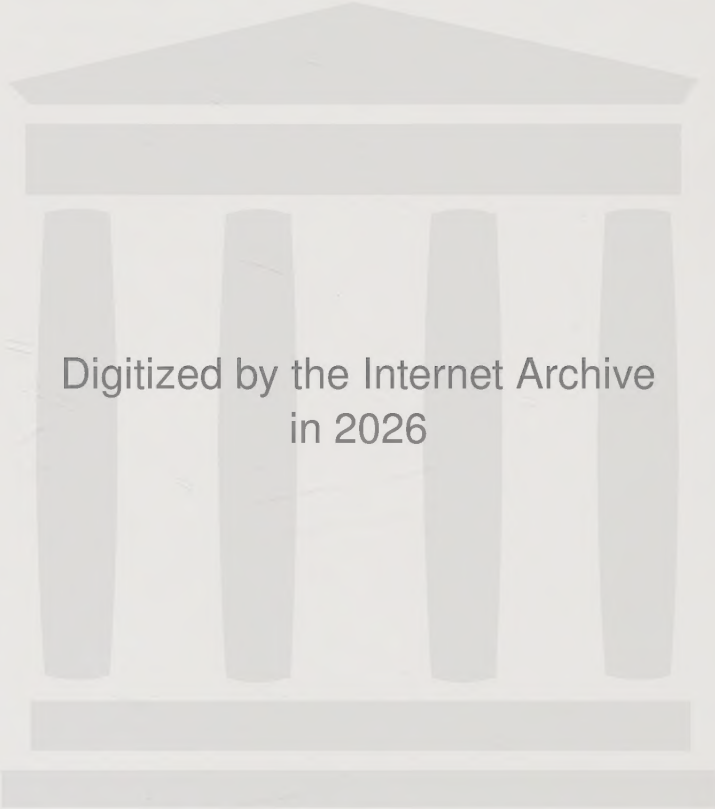
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

Vorgelegt von
KURT SCHOCH
von Zürich und Bauma

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. W. Löffler
Zürich 1954

KURT SCHOCH

Zur Frage der Beeinflussung
des ACTH-Eosinophilentests
durch Heparin



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507227_0131

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Zürich
(Direktor: Prof. Dr. W. Löffler)
Arbeit unter Leitung von Dr. A. F. Essellier, Oberarzt

Zur Frage der Beeinflussung des ACTH-Eosinophylentests durch Heparin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

Vorgelegt von
KURT SCHOCH
von Zürich und Bauma

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. W. Löffler

Zürich 1954



INHALTSÜBERSICHT

A. ACTH und eosinophiles Zellsystem	7
B. Heparin und eosinophiles Zellsystem	8
C. ACTH und Heparin bzw. Antithrombin	8
D. Heparin und Glucocorticoid-Eosinopenie	10
E. Eigene Untersuchungen	11
I. Methodik und Material	11
II. Ergebnisse	13
F. Diskussion	15
I. Zur Bewertung der Eosinophilen-Bestimmungen und des ACTH-Eosinophilentests	15
II. Zur Frage der Hemmung der Glucocorticoid-Eosinopenie durch Heparin	18
G. Zusammenfassung	21

A. ACTH und eosinophiles Zellsystem

Der ACTH-Eosinophilentest ist eine der wichtigsten Funktionsprüfungen der Nebennierenrinde (36). Verschiedene Autoren haben sich mit der Frage befasst, ob nicht auch andere Faktoren als die Nebennierenrindenfunktion den Ausfall dieses Tests beeinflussen. Eine solche Wirkung wurde dem retikuloendothelialen System (8, 9, 10) und dem Heparin (13, 14, 39, 40) zugeschrieben. Die Frage der Beeinflussung des ACTH-Eosinophilentests durch Heparin erscheint uns besonders wichtig, weil Heparin oder heparinähnliche Stoffe schon normalerweise im Blut vorkommen und deshalb Schwankungen dieses Spiegels am Ausfall des ACTH-Eosinophilentests mitbeteiligt sein könnten.

ACTH führt beim Nebennieren-Gesunden, durch Ausschüttung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde, zu einem eindeutigen konstanten Abfall der eosinophilen Granulocyten im Blut. Diese Tatsache wird im Thorn-Test diagnostisch ausgewertet (36). Adrenalin, Insulinhypoglykaemie, Elektroschock, Cardiazolschock, Operationen, Geburten, Fieber, Hunger, sowie jede andere Art von «Stress», bewirken durch Aktivierung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems ebenfalls einen signifikanten Abfall der Blut-Eosinophilen. Das Ausmass des eosinopenischen Effektes beim Nebennieren-Gesunden ist abhängig von der Höhe des Ausgangswertes der Eosinophilen im Blut und von der Dauer der Einwirkung des ACTH, während, von einem Schwellenwert an, die Höhe der einzelnen ACTH-Gabe eine untergeordnete Rolle spielt (8,31).

Wie diese Verminderung der im Blut zirkulierenden Eosinophilen zustande kommt, ist umstritten. Godlowski (13, 14) und Muchrcke, Lewis und Karcik (23) nehmen eine direkte Zerstörung der Eosinophilen durch Glucocorticoide *in vivo* an. Padawer und Gordon (24) gelangen zum gleichen Schluss, da sie nach subcutanen Cortison-Injektionen eine Vermehrung degenerierter Eosinophilen im peripheren Blut beobachteten. Panzenhagen und Speirs (25) konnten an Eosinophilen in der Peritonealflüssigkeit von Mäusen nach intraperitonealer Injektion von Cortison keine Veränderungen nachweisen. Godlowski (13, 14) beschreibt auch *in vitro* eine eosinolytische Wirkung der Glucocorticoide. Im Gegensatz dazu fanden Essellier, Jeanneret, Kopp und Morandi (7) bei *in vitro* Untersuchungen mit verschiedenen Steroiden keine eosinolytische Wirkung. Sie lehnen daher, in Übereinstimmung mit Baldridge, Kligman, Lipnik und Pillsbury (2), und Coste, Delbarre und Basset (4), einen eosinolytischen Effekt dieser Hormone *in vitro* ab.

Eine Hemmung der eosinophilen Myelopoese durch ACTH wird nur von wenigen Autoren angenommen (15, 21). Die meisten Untersucher fanden keine Veränderung der Bildung von Eosinophilen im Knochen-

mark unter der Wirkung von Glucocorticoiden (6, 12, 16, 17, 27, 32, 34, 37).

Auf die Wichtigkeit des retikuloendothelialen Systems (RES) beim Abbau der Eosinophilen haben Essellier und Wagner (10) hingewiesen. Sie konnten zeigen, dass nach Blockierung des RES mit Vitalfarbstoffen (Trypanblau) der eosinopenische Effekt des ACTH ausbleibt. In letzter Zeit nehmen Essellier, Jeanneret und Morandi (8) an, dass der Abfall der Eosinophilen im Blut nach ACTH einerseits auf einer Hemmung der Ausschwemmung der Eosinophilen aus dem Knochenmark, anderseits auf einem vermehrten Abbau im RES beruht.

B. Heparin und eosinophiles Zellsystem

Die Frage, ob Heparin, auf dessen Bedeutung für die Blutgerinnung hier nicht eingegangen werden soll, einen Einfluss auf die Zahl der im Blut zirkulierenden Eosinophilen hat, ist umstritten. Godlowski (13, 14) beobachtete an drei Hunden, nach intravenöser Gabe sehr hoher Dosen von Heparin (25.000 IE) eine Vermehrung der Eosinophilen innerhalb 4 Stunden. Kelemen, Majoros und Janovics (18) fanden bei der Ratte nach Verabreichung noch grösserer Dosen von Heparin (6 mgr/100 gr Körpergewicht = 600 IE/100 gr und mehr) eine Zunahme der Eosinophilen, die 15 Minuten nach der intravenösen Heparin-gabe auftrat und etwa 24 Stunden dauerte. Kleinere Heparin-Dosen (2—3 mgr/100 gr Körpergewicht = 200—300 IE/100 gr) bewirkten dagegen keinen Anstieg der Blut-Eosinophilen. Nach denselben Autoren kann die nach Verabreichung grosser Heparinmengen auftretende Eosinophilie durch traumatischen oder operativen Schock verhindert werden. Beim Menschen konnten Kelemen, Majoros und Janovics mit Heparin-Dosen zwischen 150—250 mgr (= 15.000 bis 25 000 IE) in den ersten 4 Stunden keine Vermehrung der Eosinophilen im Blut nachweisen. Daraus schliessen sie, dass Heparin in der physiologischen Regulation der zirkulierenden Eosinophilen kaum eine Rolle spielen dürfte.

C. ACTH und Heparin bzw. Antithrombin

Es ist bekannt, dass unter Verabreichung von ACTH und Cortison relativ häufig Thrombophlebitiden auftreten und dass auch nach Operationen, Geburten und anderen «Stress» die Thromboseneigung besonders gross ist. Diese Tatsachen machen Beziehungen zwischen ACTH und Blutgerinnung wahrscheinlich.

Smith, Margulis, Brennan und Monto (35) fanden bei drei gesunden Kontrollpersonen 4 Stunden nach intramuskulärer Injektion von 20 mgr ACTH einen signifikanten Anstieg von Heparin oder heparinähnlichen Stoffen und eine Verlängerung der Gerinnungszeit. Von 19 untersuchten Patienten, die mit ACTH behandelt wurden, zeigten 12 Patienten 24 Stunden nach Beginn der ACTH-Behandlung eine Verkürzung und 1 Patient eine Verlängerung der Gerinnungszeit, während bei 6 Patienten keine Änderung derselben erkennbar war. Prothrombin- und Antithrombin-Titer wiesen in einzelnen Fällen einen Anstieg, in andern einen Abfall auf. Eine Änderung der Thrombocytenzahl konnten Smith, Margulis, Brennan und Monto nicht beobachten. Zollikofer (41) fand dagegen bei einmaliger oder fraktionierter Verabreichung von 25 mgr ACTH in 24 Stunden als konstantestes Phänomen einen, sein Maximum nach durchschnittlich 6 Stunden erreichenden Anstieg der Thrombocyten, der zwischen 18% und 115% des Ausgangswertes schwankte. Das Antithrombin, dem er Heparin-Charakter zuschreibt, sank in 5 von 6 Fällen ab, während der Prothrombinspiegel in 3 Fällen einen Anstieg, in 2 Fällen einen Abfall zeigte. Verstraete, Vandenbroucke und Verwilghen (38) beobachteten eine Verkürzung der Gerinnungszeit nach ACTH und Cortison, während Antithrombin und Prothrombin keine übereinstimmenden Veränderungen zeigten. Godlowski (13, 14), sowie Cosgriff und Diefenbach (3) erwähnen ebenfalls eine Verkürzung der Gerinnungszeit durch ACTH. Die Tatsache, dass beim Addison-Kranken, bei welchem der ACTH-Spiegel erhöht ist, Heparin oder heparinähnliche Stoffe im Blut stark vermehrt sind, und die Gerinnungszeit entsprechend verlängert ist, lässt ebenfalls Beziehungen zwischen ACTH und Heparin vermuten (35).

Weissbecker und Hitzelberger (39) deuten die verschiedenen Befunde in dem Sinne, dass jede Erhöhung des ACTH-Gehaltes im Blut, sei es durch «Stress», ACTH-Injektion oder beim Addison, zu einem gegenregulatorischen Anstieg des Heparins, jede Senkung des Blut-ACTH zu einem Abfall des Heparin-Titers führe. Kelemen, Majoros und Janovics (18) nehmen allgemein an, dass verkürzte Gerinnungszeit mit Eosinopenie, verlängerte Gerinnungszeit mit Eosinophilie einhergehe.

Der Einfluss des ACTH auf den Heparin- bzw. Antithrombintiter scheint noch nicht geklärt zu sein. Dass in Bezug auf die Blutgerinnung auch in vitro Beziehungen zwischen ACTH und Heparin bestehen, konnten Köhler, Loll und Schröer (19) zeigen. Sie fanden, dass ACTH den gerinnungshemmenden Effekt von Heparin in vitro aufzuheben vermag. Sie vermuten, dass sowohl die bei der Therapie mit ACTH auftretenden Fälle von Thrombophlebitiden, als auch gewisse Blutungen, die Folge eines gestörten Mengenverhältnisses ACTH-Heparin sein könnten.

D. Heparin und Glucocorticoid-Eosinopenie

Godlowski (13, 14) hat als erster versucht, den eosinopenischen Effekt von ACTH durch Heparin zu hemmen. Er fand, dass sehr hohe Dosen von Heparin (1500 IE/kg Körpergewicht), 10 Minuten vor der Hormongabe intravenös injiziert, den Sturz der Eosinophilen im Blut nach ACTH (2 Versuchspersonen), sowie nach Cortison (1 Hund), Adrenalin (2 Versuchspersonen) und nach Insulin (2 Hunde) verhindern. In einigen Fällen beobachtete er unter der Heparinwirkung sogar einen Anstieg der Eosinophilen. Kleinere Dosen von Heparin (100 IE/kg), die genügen, um die Blutgerinnung zu verhindern, vermochten hingegen den Abfall der Eosinophilen nach Adrenalininjektion (1 Versuchsperson und 2 Hunde) nicht aufzuheben. Die nach ACTH und Cortison auftretende Leukocytose wird nach Godlowski durch Heparin nicht beeinflusst. Nach seiner Ansicht hebt Heparin die eosinolytische Wirkung der Glucocorticosteroide nicht auf. Es mobilisiert aber die im Gewebe fixierten Eosinophilen und bringt sie in die Zirkulation, wo sie die von den Steroiden zerstörten Eosinophilen gewissermassen ersetzen; die Bluteosinophilie bleibt damit unverändert. In den Fällen mit geringer Gewebeseosinophilie dagegen, kann eine solche Mobilisierung nicht in genügendem Masse stattfinden; die eosinolytische Wirkung der Steroide tritt dann im Blut klar in Erscheinung.

Weissbecker und Hitzelberger (39, 40) konnten die Angaben Godlowski's in qualitativer, nicht aber in quantitativer Hinsicht bestätigen. Sie fanden bei 10 Versuchen, dass schon sehr kleine Dosen von Heparin (200 IE Liquemin Roche) den Effekt von 20 IE ACTH auf Eosinophile, Brenztraubensäure und Blutzucker aufzuheben vermögen. Die Wirkung von Cortison hingegen soll, im Gegensatz zu den Angaben Godlowski's durch Heparin nicht beeinflusst werden. Weissbecker und Hitzelberger nehmen auf Grund ihrer Untersuchungen an, dass ACTH durch Heparin inaktiviert wird und «schreiben dem Heparin eine über die Gerinnungshemmung weit hinausgehende physiologische Bedeutung» im Rahmen eines Regulationsystems ACTH-Heparin zu. Heparin soll darnach die ACTH-Aktivität steuern. Die beiden Autoren stützen ihre Hypothese von der Inaktivierung von ACTH durch Heparin auf Arbeiten von Reiss, Pincus und Mitarbeitern. Reiss, Badrick, Halkerston und Plaice (30) zeigten, dass heparinisiertes Plasma von Menschen, Ratten und Kaninchen ACTH bei 37° in 5 Minuten bis über 90% hinaus zu inaktivieren vermag, während eine gleich konzentrierte Heparinlösung auf dasselbe ACTH-Präparat keinen Effekt hatte. Weissbecker und Hitzelberger schliessen aus diesen Beobachtungen, dass das Gemisch von Heparin und Plasma ACTH inaktiviert. Es lässt sich unseres Erachtens aus diesen Ergebnissen nur folgern, dass offenbar Plasmafaktoren für die Inaktivierung von ACTH notwendig sind; ob dabei

Heparin irgend eine Rolle spielt, kann nicht entschieden werden, da Reiss und Mitarbeiter nichts über Kontrollversuche betreffend die Inaktivierung von ACTH durch Plasma ohne Heparinzusatz berichten. Auch die Versuche von Pincus, Hechter und Hopkins (26), die bei den ACTH-inaktivierenden Plasmafaktoren eine hitzestabile und eine hitzelabile Komponente nachweisen konnten, sagen über die Rolle des Heparins nichts aus.

Fasst man die bisherigen Angaben der Literatur über die Frage einer möglichen antieosinopenischen Wirkung des Heparins zusammen, so ergibt sich, dass sowohl diese Wirkung an sich, als auch deren Mechanismus umstritten sind. Zur Erklärung dieses Mechanismus wurden zwei verschiedene Hypothesen aufgestellt: Inaktivierung von ACTH durch Heparin (Weissbecker und Hitzelberger) und Mobilisierung der Eosinophilen im Gewebe durch Heparin (Godlowski).

Der Frage, ob es antagonistische Wirkungen zwischen ACTH und Heparin gibt, kommt in doppelter Hinsicht praktische Bedeutung zu: 1. Falls Heparin wirklich ACTH inaktiviert, könnte eine Erhöhung des Heparinspiegels im Blut eine funktionelle Nebennierenrinden-Insuffizienz zur Folge haben. 2. Wenn Heparin schon in niedriger Dosierung die ACTH-Wirkung auf die Eosinophilen aufzuheben vermag, dann ist der Ausfall des Thorn-Tests nicht nur vom Funktionszustand der Nebennierenrinde (36) und des RES (8, 9, 10), sondern auch von den Schwankungen des Heparin-Titers abhängig.

Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Frage zu liefern, ob und in welcher Dosierung Heparin beim Nebennieren-Gesunden den Abfall der Blut-Eosinophilen nach ACTH aufzuheben vermag. Unsere Arbeit gliedert sich in 2 Teile: Im ersten Teil wird der Einfluss kleiner «physiologischer» Mengen Heparin (200 IE) untersucht, entsprechend den Versuchen von Weissbecker und Hitzelberger, während im zweiten Teil an einer kleinen Zahl von Fällen die Wirkung höchster Dosen von Heparin (125.000 IE), entsprechend den Versuchen Godlowski's geprüft wird.

E. Eigene Untersuchungen

1. METHODE UND MATERIAL

Um die Frage der antieosinopenischen Wirkung des Heparins beim ACTH-Eosinophilentest zu prüfen, müsste man in logischer Reihenfolge bei den zu untersuchenden Fällen zuerst einen Thorn-Test, bei positivem Ausfall desselben eine kombinierte ACTH-Heparin-Belastung vornehmen. Einfachheitshalber wählten wir das umgekehrte Vorgehen, wobei beabsichtigt war, in den Fällen, in welchen nach kombinierter ACTH-Heparin-Verabreichung ein signifikanter Eosinophilenabfall im Blut ausbleiben würde, zwei Tage später einen Thorn-Test auszuführen.

1. Wirkung kleiner Dosen von Heparin (200 IE)

20 klinisch nebennierengesunde Patienten erhielten morgens 8 Uhr unmittelbar nacheinander 20 IE ACTH (Cortrophine Organon) intramuskulär und 150 IE Heparin (Liquemin Roche) intravenös. Nach 2 Stunden wurden nochmals 50 IE Liquemin intravenös injiziert. Zur Ergänzung wurden 2 weiteren Versuchspersonen, bei sonst gleicher Anordnung, 150 IE Liquemin 10 Minuten vor dem ACTH intravenös injiziert, entsprechend den zeitlichen Verhältnissen bei den Versuchen G o d l o w s k i's. Schliesslich wurden noch in 4 Fällen die gesamten 200 IE Liquemin zur gleichen Zeit wie das ACTH verabreicht.

In 6 Fällen wurde unverdünnte Liqueminlösung zu 2000 IE/cm³ mit der Mantoux-Spritze gegeben, in den andern 20 Fällen fand eine verdünnte Lösung von 1 cm³ Liquemin zu 5000 IE/cm³ in 99 cm³ steriler physiologischer NaCl-Lösung Verwendung. Die Eosinophilen wurden unmittelbar vor dem Versuch, sowie 2, 4, 6 und 8 Stunden nach der intramuskulären ACTH-Injektion gezählt.

Die Blutentnahme erfolgte in allen Fällen aus der Fingerkuppe. In einer Leukocytenpipette wurde das Blut bis zur Marke 0,5 aufgezogen und mit R a n d o l p 'scher Lösung verdünnt (28):

Lösung I

Methylenblau	0,1
Prophylenglykol	50,0
Aqua dest. ad	100,0

Lösung II

Phloxin	0,1
Propylenglykol	50,0
Aqua dest. ad	100,0

3 Teile der Lösung I mit 7 Teilen der Lösung II ergeben die gebrauchsfertige Verdünnungslösung, die aber höchstens 4 Stunden haltbar ist. Die Auszählung der Eosinophilen erfolgte in der Spencer Bright Line Kammer. Für jeden Wert wurde aus zwei verschiedenen Pipetten je eine doppelte Zählkammer ausgezählt.

Alle Patienten waren während der ganzen Untersuchung im Bett und erhielten die gewohnte Kost zu gewohnter Zeit, da nach Untersuchungen von R u d (33), von D o n a t o und S t r u m i a (5) längeres Fasten an sich zu einem deutlichen Abfall der Eosinophilen im Blut führt, während Mahlzeiten nur eine inkonstante und sehr kurzfristige Eosinophilen-Zunahme bedingen (33). Alle anderen Medikamente wurden abgesetzt.

Das Alter der Patienten schwankte zwischen 21 und 68 Jahren; 12 waren männlichen, 14 weiblichen Geschlechts. Die Eosinophilenzahl bei Beginn der Untersuchung betrug zwischen 139 und 1955/mm³. Es wurden nur Fälle gewählt, bei denen das Grundleiden keine Aenderung der Blut-Eosinophilie während der Untersuchungsdauer erwarten liess.

2. Wirkung sehr hoher Dosen von Heparin (125.000 IE)

9 klinisch nebennierengesunden Patienten wurden um 07.50 Uhr 100.000 IE Heparin intravenös gespritzt. Das ACTH (Cortrophine Or-

ganon) wurde wie in den Fällen mit niedriger Dosierung von Heparin um 08.00 Uhr, also 10 Minuten nach Heparin-gabe, intramuskulär appliziert. 5 Patienten erhielten 30 IE, 4 Patienten 45 IE ACTH. Eine und zwei Stunden nach der ACTH-Gabe wurden nochmals je 12.500 IE Heparin verabfolgt.

Wir verwendeten folgende Heparin-Präparate: Liquemin Roche (3 Fälle), Heparin Vitrum (2 Fälle), Heparin Novo (2 Fälle) und Heparin Boots (2 Fälle).

Die Eosinophilen wurden vor der ersten Heparin-gabe, sowie 2, 4, 6 und 8 Stunden nach ACTH gezählt. Die Ausgangswerte betrugen in unseren Fällen zwischen 189 und 378/mm³.

Die Auswahl der Patienten erfolgte nach den gleichen Gesichtspunkten, wie bei den Untersuchungen mit kleinen Heparindosen. Wegen der ungewöhnlich hohen, hier zur Anwendung gelangenden Heparin-mengen, wurden zudem nur klinisch leicht Kranke oder Rekonvaleszenten herangezogen. Es wurde streng darauf geachtet, dass nur Fälle ohne Blutungsneigung, mit normaler Thrombocytenzahl und unveränderter Blutungs-, Gerinnungs- und Prothrombinzeit untersucht wurden. Um die Gefahr allergischer Reaktionen zu vermindern, wurden auch alle Patienten ausgeschieden, die früher einmal mit Heparin behandelt worden waren. Von den 9 untersuchten Patienten waren 4 männlichen, 5 weiblichen Geschlechts; das Alter schwankte zwischen 18 und 57 Jahren.

II. E R G E B N I S S E

1. Wirkung kleiner Dosen von Heparin (200 IE)

Alle 20 Fälle der Hauptserie zeigten einen eindeutigen Abfall der Eosinophilen im Blut (Tabelle 1). Die Verminderung in Prozenten des Ausgangswertes betrug (arithmetischer Mittelwert der 20 Fälle):

2 Stunden nach ACTH	— 30 ± 4,46%*
4 Stunden nach ACTH	— 64 ± 3,78%
6 Stunden nach ACTH	— 71 ± 4,14%
8 Stunden nach ACTH	— 64 ± 5,82%

*) Der mittlere Fehler des arithmetischen Mittelwertes wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$E = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$$

E = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

$\sum d^2$ = Summe der Quadrate der Differenzen vom arithmetischen Mittelwert.

n = Anzahl der Bestimmungen.

Fälle Nr.	Ausgangswert	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 8 Std.
1	278	112	117	144	281
2	311	188	66	77	72
3	222	156	150	111	112
4	167	78	67	28	89
5	322	261	116	83	83
6	405	194	61	22	67
7	222	100	28	56	67
8	844	777	244	177	194
9	244	267	44	17	11
10	211	78	33	11	44
11	178	128	83	28	83
12	250	172	83	11	44
13	311	306	144	39	17
14	173	117	83	83	67
15	139	94	50	67	122
16	361	278	139	156	144
17	1 433	1 422	1 100	811	977
18	422	311	77	88	111
19	222	156	78	50	17
20	733	522	316	450	333

Tabelle 1: Eosinophilenzahl pro mm³ vor und 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Verabreichung von 20 IE ACTH i. m. und 200 IE Heparin (Liquemin Roche) i. v.

Auch die 2 Fälle, bei denen 150 IE Heparin 10 Minuten vor ACTH injiziert worden waren und die 4 Fälle, in denen die gesamten 200 IE Heparin zur gleichen Zeit wie das ACTH verabreicht worden waren, zeigten einen entsprechenden eindeutigen Abfall der Eosinophilen im Blut.

2. Wirkung höchster Dosen von Heparin (125.000 IE)

Auch bei dieser sehr hohen Heparin-Dosierung kam es in allen 9 Fällen nach ACTH zu einem eindeutigen Abfall der Eosinophilen im Blut (Tabelle 2). Die Verminderung der Eosinophilenzahl in Prozenten des Ausgangswertes betrug (arithmetischer Mittelwert der 9 Fälle):

2 Stunden nach ACTH	— 17 ± 6,23%
4 Stunden nach ACTH	— 58 ± 4,36%
6 Stunden nach ACTH	— 68 ± 1,74%
8 Stunden nach ACTH	— 64 ± 3,66%

Fälle Nr.	ACTH IE	Heparinpräparat	Ausgangs- wert	Eosinophile pro mm ³			
				nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 8 Std.
1	30	Liquemin Roche	300	300	206	78	89
2	30	Liquemin Roche	311	261	144	111	122
3	45	Liquemin Roche	361	273	156	122	133
4	30	Heparin Vitrum	378	294	178	133	206
5	45	Heparin Vitrum	250	194	67	56	61
6	30	Heparin Novo	239	94	56	94	44
7	45	Heparin Novo	256	267	89	83	122
8	30	Heparin Boots	189	178	83	56	78
9	45	Heparin Boots	306	294	128	100	114

Tabelle 2: Eosinophilenzahl pro mm³ vor und 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Verabreichung von 30—45 IE ACTH i. m. und 125.000 IE verschiedener Heparinpräparate i. v.

F. Diskussion

I. ZUR BEWERTUNG DER EOSINOPHILEN-BESTIMMUNGEN UND DES ACTH-EOSINOPHILENTTESTS.

Voraussetzung für die Bewertung unserer Ergebnisse ist die Kenntnis der Fehlermöglichkeiten bei der Eosinophilen-Bestimmung, der Spontanschwankungen der Eosinophilen im Blut und des Ausfalls des Thorn-Tests bei intramuskulärer ACTH-Gabe.

Rud (33) hat die möglichen Fehlerquellen bei der Eosinophilen-Zählung in 5 Gruppen eingeteilt: 1. Fehler bei der Identifizierung der Eosinophilen. 2. Fehler, die auf ungenaues Arbeiten zurückgehen: Ungenaues Aufziehen von Blut und Farblösung in der Pipette, Arbeiten bei verschiedener Temperatur sowohl der Mischungen einerseits, wie der Pipetten und Zählkammern andererseits, ungenügende Durchmischungen des Blutes mit der Farblösung, Fehler bei der Zählung oder Ausrechnung der Eosinophilen. 3. Systematische Fehler: Ungenauigkeit von Pipetten oder Zählkammern. 4. Fehler, die sich aus eventuellen Unterschieden der Verteilung der Eosinophilen im gesamten Gefäßgebiet ergeben. 5. Zufallsmässige Fehler: Unvermeidliche kleine Ungenauigkeiten beim Arbeiten mit Pipetten und Zählkammern, ungleichmässige Verteilung der Eosinophilen in Pipette oder Zählkammer.

Fehler der Gruppe 1 und 2 lassen sich durch genügende Uebung weitgehend vermeiden, Fehler der Gruppe 3 können durch Kontrolle der Instrumente und Verwendung der gleichen Instrumente bei allen Untersuchungen ausgeschaltet werden. Was die Fehler der Gruppe 4 betrifft, fand R u d gute Uebereinstimmung zwischen Blutproben aus beiden Ohrläppchen, zwischen Ohrläppchen und Finger, sowie zwischen Finger und Cubitalvene.

Die unvermeidlichen Fehler der Gruppe 5 bestimmen die eigentliche Ungenauigkeit der Methode. Um sie zu ermitteln, hat R u d von verschiedenen Personen 190 Blutproben von 5—10 cm³ entnommen und nach immer wieder neuer Durchmischung je 10 Bestimmungen ausgeführt. Dabei zeigte sich, dass, wie zu erwarten, die Streuung* mit der grösseren Zahl der Eosinophilen pro mm³ zunahm, der Variationskoeffizient**, der das Verhältnis zwischen Streuung und arithmetischem Mittelwert der Eosinophilen pro mm³ angibt, dagegen abnahm. Die Genauigkeit der Methode wächst also mit der Zunahme der Eosinophilen pro mm³. Diese Beziehung soll an einigen Beispielen gezeigt werden. (Zahlen nach R u d):

Eosinophile pro mm ³ (arith. Mittelwert von 10 Bestimmungen)	Streuung	Variationskoeffizient
1	2,54	254
10	7,48	75
119	21,11	17
224	27,96	12
515	45,37	9
1 100	61,84	6

Die Tagesschwankungen der Eosinophilen im Blut unterliegen nach ausführlichen Untersuchungen von R u d (33) einem regelmässigen Rhythmus. Die Eosinophilen sinken am Vormittag ab, erreichen zwischen 9 und 11 Uhr ein Minimum, das ca. 20% unter dem 8 Uhr-Wert liegt, steigen dann wieder an, um kurz nach Mittag den Ausgangswert

*) Die Streuung einer Verteilung (mittlere quadratische Abweichung, engl.: standard deviation)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

$\sum d^2$ = Summe der Quadrate der Differenzen vom arith. Mittelwert.

n = Anzahl der Bestimmungen.

**) Der Variationskoeffizient ist gleich:

$$V = 100 \frac{\sigma}{m} \quad \begin{array}{l} \sigma = \text{Streuung} \\ m = \text{arithmetischer Mittelwert} \end{array}$$

zu erreichen und in der Mitte der Nacht bis ca. 30% über den 8 Uhr-Wert anzusteigen. Nach Donato und Strumia (5) sind die Tagesschwankungen charakterisiert durch ein Minimum am Mittag, einen Anstieg am Abend und ein Maximum während der Nacht, wobei die Werte unabhängig von den Schwankungen der Gesamt-Leukocytenzahl zu sein scheinen. Lützenkirchen (20) beobachtete in 35 Fällen zwischen 8 und 12 Uhr 21 mal eine Abnahme der Eosinophilen, die in 10 Fällen mehr als 30% und in 4 Fällen mehr als 50% betrug. Ebenso fand Appel (1) im Laufe des Vormittages regelmässig eine spontane Abnahme der Eosinophilen, die zwischen 8 und 12 Uhr im Durchschnitt 28% des Ausgangswertes betrug, in 20% der Fälle aber mehr als 50% des Ausgangswertes erreichte. Recant, Hume, Forsham und Thorn (29) stellten bei 6 untersuchten Personen zwischen 8 und 12 Uhr zweimal eine Abnahme und zweimal eine Zunahme fest, während in 2 Fällen keine deutlichen Schwankungen auftraten. In allen 6 Fällen wurde am Nachmittag eine Zunahme über den 8 Uhr-Wert hinaus gefunden. Nach Weissbecker (40) wird in der Zeit von 8 bis 12 Uhr fast immer ein spontaner Abfall der Eosinophilen gefunden, während vom spätern Vormittag bis zum Abend ein mehr oder weniger konstantes Tagesminimum herrschen soll.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Ansicht der meisten Autoren die Eosinophilen in der Zeit nach 8 Uhr absinken. Umstritten sind die Fragen, wie gross dieser Abfall durchschnittlich ist, wann ein neuer Anstieg einsetzt und wann der Ausgangswert wieder erreicht wird.

Beim Fasten tritt nach Rud (33), Donato und Strumia (5) der für die Tagesschwankungen charakteristische morgendliche Abfall der Eosinophilen unverändert auf, der Wiederanstieg im Laufe des Tages bleibt aber aus: die Eosinophilen sinken im Gegenteil noch weiter ab, wobei der Grad des Abfalls von der Länge der Hungerperiode abhängt. 1 Stunde nach Nahrungsaufnahme beginnen die Eosinophilen wieder anzusteigen, um nach 3 Stunden den Ausgangswert wieder zu erreichen (33). Appel (1) konnte, im Gegensatz zu diesen Beobachtungen, keinen Einfluss des Fastens auf den 24-Stunden-Rhythmus der Eosinophilen nachweisen.

Rud (33), Lützenkirchen (20), sowie Donato und Strumia (5) machen darauf aufmerksam, dass die regelmässigen Tagesschwankungen im Einzelfall durch kurzfristige Spontanschwankungen, die nach Rud bis 60% in einer halben Stunde ausmachen können, maskiert werden.

In Bezug auf die Bewertung des Thorn-Tests können aus den angeführten Untersuchungen über Tagesschwankungen und kurzfristige Schwankungen der Eosinophilen im Blut folgende Schlüsse gezogen werden: Der Thorn-Test sollte zeitlich so festgelegt werden, dass der zu

erwartende Eosinophilenabfall in die Zeit des Anstieges der Spontanschwankungen fällt. Er würde also in Bezug auf die zeitlichen Verhältnisse mit Vorteil derart ausgeführt, dass die entscheidende Eosinophilen-Bestimmung auf die Nachmittagsstunden fällt.

II. ZUR FRAGE DER HEMMUNG DER GLUCOCORTICOID-EOSINOPENIE DURCH HEPARIN

Weissbecker und Hitzelberger (39) fanden in ihren Untersuchungen über die Wirkung kleiner Dosen von Heparin (200 IE) auf die Blut-Eosinopenie nach ACTH auf Brenztraubensäure und Blutzucker an 10 Versuchspersonen folgende Resultate:

	ACTH nach 4 Stunden	Heparin nach 4 Stunden	ACTH + Heparin nach 4 Stunden
Eosinophile	— 72%	— 2%	— 11
Brenztraubensäure	+ 45%	+ 40%	+ 1
Blutzucker	+ 40%	— 40%	+ 3

In Bezug auf die Wirkung sehr hoher Dosen von Heparin (125.000 IE) fand Godlowski (13, 14) in beiden untersuchten Fällen eine Zunahme der Eosinophilen im Blut trotz ACTH, die nach 4 Stunden 58% bzw. 28% des Ausgangswertes betrug.

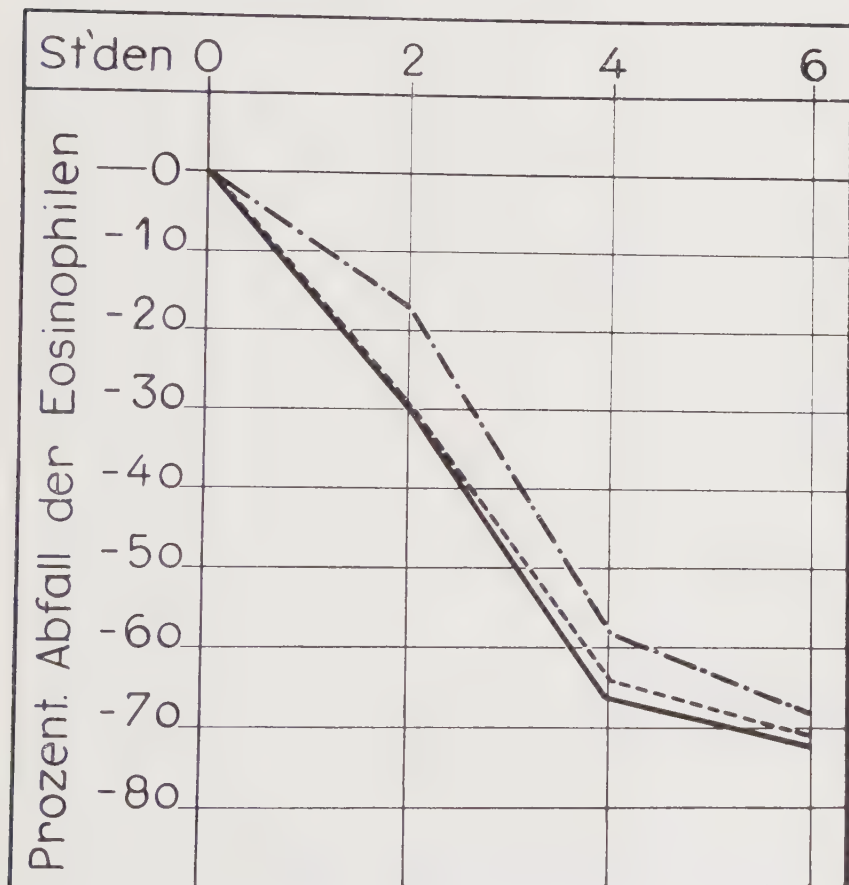
Auf Grund eigener Untersuchungen (Tabelle 3 und Kurve 1) können wir weder die Ergebnisse von Weissbecker und Hitzelberger, noch diejenigen von Godlowski bestätigen.

Zeit nach ACTH- Injektion	Kombinierte ACTH-Heparin-Belastung		Kontroll-Fälle
	ACTH 20 IE i. m. + Heparin 200 IE i. v.	ACTH 20—45 IE i. m. + Heparin 125.000 IE i. v.	ACTH 20 IE i. m.
	(20 Fälle)	(9 Fälle)	(16 Fälle)
2 Std.	30 ± 4,46	17 ± 6,23	30 ± 7,89
4 Std.	64 ± 3,78	58 ± 4,36	66 ± 7,88
6 Std.	71 ± 4,14	68 ± 1,74	72 ± 5,79

Tabelle 3: Vergleich des ACTH-Eosinophilentests und der kombinierten ACTH-Heparinbelastung.
Verminderung der Blut-Eosinophilen in Prozenten des Ausgangswertes.

Unsere Untersuchungen zeigen eindeutig, dass die eosinopenische Wirkung des ACTH durch kleine Dosen Heparin (200 IE) nicht aufgehoben wird. Auch sehr hohe Dosen von Heparin (125.000 IE) vermögen diesen Effekt nicht aufzuheben. Der Abfall der Eosinophilen nach 4 und 6

Abbildung 1: Vergleich der eosinopenischen Wirkung von ACTH und ACTH + Heparin.



Verminderung der Blut-Eosinophilen in Prozenten des Ausgangswertes nach 2, 4 und 6 Stunden bei
 16 Kontrollfällen ACTH 20 I. E. (—),
 20 Fällen ACTH 20 I. E. + Heparin 200 I. E.
 (- - -) und
 9 Fällen ACTH 20—45 I. E. + Heparin 125.000
 I. E. (- . - . -) (Mittelwertskurven)

Stunden ist gleich, wie bei den Kontrollfäden und bei den Fällen mit kleinen Heparindosen. Der Unterschied des 2 Stundenwertes ist statistisch nicht signifikant*.

Irgendwelche Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Heparin-Präparate waren nicht festzustellen. Auch ein Einfluss der einzelnen Krankheiten war bei unseren klinisch nebennierengesunden Patienten weder bei geringer, noch bei sehr hoher Heparin-Dosierung nachweisbar.

Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten von Weissbecker und Hitzelberger und von Godlowski, obwohl wir uns an die gleiche Versuchsanordnung hielten: Gleiche zeitliche Verhältnisse, gleiche Heparin- und ACTH-Dosierung wie Weissbecker und Hitzelberger, Anwendung von 4 verschiedenen Heparinpräparaten in den Fällen mit hoher Dosierung (entsprechend den Versuchen Godlowski's). Wie weit die kleinere Zahl der Untersuchungen dieser beiden Autoren (Weissbecker und Hitzelberger 10 Fälle, Godlowski 2 Fälle), sowie die Tatsache, dass sich ihre Resultate auf einen einzigen Wert (den 4-Stunden-Wert) stützen, diese Diskrepanz gegenüber unseren Ergebnissen erklären, sei dahingestellt. Auf Grund unserer Untersuchungen kann festgehalten werden, dass Heparin den eosinopenischen Effekt des ACTH nicht aufhebt.

Gegen eine antagonistische Wirkung zwischen ACTH und Heparin sprechen auch die Untersuchungen von Markes (22) in den Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche, Basel. Dieser Autor machte am Kaninchen folgende Feststellungen: 1. Bei intravenöser Injektion von 2–16 mgr/kg Heparin (=200–1600 I. E./kg) zeigte sich keine regelmäßige Beeinflussung der Brenztraubensäure im Blut. 2. Bei intravenösen und subcutanen ACTH-Injektionen war die Brenztraubensäure im Blut vermehrt. 3. Bei kombinierten intravenösen Heparin- und intravenösen oder subcutanen ACTH-Injektionen kam es zu einer gleichen Steigerung der Brenztraubensäure im Blut, wie nach ACTH allein.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen liefern weder der ACTH-Eosinophilentest noch der ACTH-Brenztraubensäuretest (Markes) Argumente für das von Weissbecker und Hitzelberger (39) postulierte Regulationssystem ACTH-Heparin.

*) Als significant betrachten wir nur Unterschiede, bei denen:

$$m_1 - m_2 > 3 \times \sqrt{(Em_1)^2 + (Em_2)^2}$$

m_1, m_2 = arithmetische Mittelwerte

Em_1, Em_2 = mittlerer Fehler der Mittelwerte m_1, m_2

G. Zusammenfassung

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem von Weissbecker und Hitzelberger (39, 40), sowie von Godlowski (13, 14) angenommenen Antagonismus des Heparins gegenüber dem ACTH in Bezug auf den Eosinophilen-Test.

Der Ausfall des ACTH-Eosinophilentests wurde in 26 Fällen mit gleichzeitiger oder vorgängiger Verabreichung von 200 IE Heparin und in 9 Fällen mit vorgängiger Verabreichung von 125.000 IE Heparin untersucht. Der Test fiel in beiden Gruppen gleich aus, wie bei einer Gruppe von 16 Kontrollfällen.

Unsere Untersuchungen ergeben somit keine Stütze für den von Weissbecker und Hitzelberger, sowie von Godlowski angenommenen Antagonismus zwischen ACTH und Heparin in Bezug auf den ACTH-Eosinophilentest, bzw. für das Vorliegen eines Regulationssystems ACTH-Heparin.

Herrn Prof. Dr. W. Löffler, an dessen Klinik ich die vorliegende Arbeit ausführen konnte, bin ich zu grossem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. A. F. Essellier möchte ich für die Ueberlassung des Themas, für sein Interesse und für seine wertvollen Ratschläge meinen besten Dank aussprechen.

Fräulein S. Willy und Fräulein H. Troeger, die mich in die Untersuchungstechnik eingeführt haben, bin ich für ihre Hilfe herzlich dankbar.

CURRICULUM VITAE

Am 14. Oktober 1928 wurde ich in Zürich geboren. Hier besuchte ich die Primarschule und trat anschliessend in das Gymnasium der Kantonsschule ein, wo ich als Schüler der Realabteilung 1947 die Maturitätsprüfung bestand.

Mein Medizinstudium absolvierte ich an der Universität Zürich und schloss es im Herbst 1953 mit dem Staatsexamen ab.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Appel, W.: Ueber die Tagesschwankungen der Eosinophilen. Zeitschr. f. d. gesamte exper. Med. 104:15 (1939).
2. Baldridge, G. D., Kligman, A. M., Lipnik, M. J. and Pillsbury, D. M.: In vitro effects of cortisone on mesodermal tissue. Arch. Path. 51:593 (1951).
3. Cosgriff, S. W., Diefenbach, A. F. and Vogt, W. Jr.: Hypercoagulability of the blood associated with ACTH and cortisone therapy. Amer. J. Med. 9:752 (1950).
4. Coste, F., Delbarre, F. et Basset, G.: Essais de mise en évidence dans le sang des sujets traités par la cortisone d'une substance anti-inflammatoire. Rev. rhum. 19:327 (1952).
5. Donato, R. A. and Strumia, M. M.: An exact method of chamber count of eosinophils in capillary blood and its application to the study of the diurnal cycle. Blood 7:1020 (1952).
6. Durgin, M. L. and Meyer, R. K.: Effect of adreno-cortical extract on bone marrow eosinophils of mice. Endocrinology 48:518 (1951).
7. Essellier, A. F., Jeanneret, P., Kopp, E. and Morandi, L.: Evidence against destruction of eosinophils by glucocorticoids as shown by in vitro experiments. Endocrinology 54:477 (1954).
8. Essellier, A. F., Jeanneret, R. L. and Morandi, L.: The mechanism of glucocorticoid eosinopenia. Contribution to the physiology of the eosinophil granulocytes. Blood 9:531 (1954).
9. Essellier, A. F., Marti, H. R. und Morandi, L.: Die Rolle des retikulo-endothelialen Systems für die eosinopenische Reaktion unter Glucocorticosteroiden. Acta haemat. 11:21 (1954).
10. Essellier, A. F. und Wagner, K. F.: Ueber den Wirkungsmechanismus des ACTH auf das eosinophile Zellsystem. Acta haemat. 8:63 (1952).
11. Essellier, A. F. und Wagner, K. F.: Das Verhalten der Eosinophilen in Blut und Knochenmark auf Verabreichung von adrenocorticotropem Hormon. Klin. Wschr. 30:705 (1952).
12. Finch, S. C., Crockett, C. L. Jr., Ross, J. F. and Bayless, T. B.: Hematologic changes with ACTH and cortisone therapy of rheumatoid arthritis. Proc. Second Clin. ACTH Conference. Vol. II, p. 589.
13. Godlowski, Z. Z.: The fate of eosinophils in hormonally induced eosinopenia and its significance. J. Clin. Endocrinol. 8:102 (1952).
14. Godlowski, Z. Z.: Enzymatic concept of anaphylaxis and allergy. E. & S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 1953.
15. Goldmann, R., Adams, W. S., Beck, W. S., Levine, M. and Basset, S. H.: The effect of ACTH on one case of periarthritis nodosa. Proc. First Clin. ACTH Conference p. 437. New York, Blakiston Comp., 1950.
16. Gross, R. und Siecke, U.: Ueber die Beziehungen zwischen Blut- und Knochenmarkswirkungen des adrenocorticotropen Hormons, besonders bei den Eosinophilen. Klin. Wschr. 30:456 (1952).
17. Hävermark, N. S. und Nordenson, N. G.: Hematological changes in a case of rheumatoid arthritis treated with adrenocorticotropic hormone. Acta haemat. 4:193 (1950).
18. Kelemen, E., Majoros, M. and Janovics, T.: Eosinophils and blood clotting. Brit. Med. J. 1951, vol. 1, p. 1391.
19. Köhler, V., Loll, H. und Schröer, H.: Aufhebung des Heparineffektes auf die Blutgerinnung durch ACTH. Klin. Wschr. 31:616 (1953).
20. Lützenkirchen, A.: Eosinopenische Reaktion und Hypophysen-Nebennierenrinden-System bei Hautkrankheiten. Arch. f. Dermat. u. Syph. 193:495 (1951).

21. Mach, R. S., Brügger, Y., Della Santa, R. et Fabre, J.: L'hormone hypophysaire corticotrope. Schweiz. med. Wschr. 80:5 (1950).
22. Markees, S.: Persönliche Mitteilung.
23. Muehrcke, R. C., Lewis, J. L. and Karck, R. M.: The effects of cortisone and heparine on eosinophils in defibrinated human blood. Science 115:377 (1952).
24. Padawer, J. and Gordon, A. S.: Eosinopenia and degenerating eosinophilic leukocytes in blood. Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. 80:581 (1952).
25. Panzenhagen, H. and Speirs, R. S.: Effect of horse serum, adrenal hormones and histamine on the number of eosinophils in the blood and peritoneal fluid of mice. Blood 8:536 (1953).
26. Pincus, G., Hechter, O. and Hopkins, T.: The Inactivation of ACTH in mammalian blood. J. Clin. Endocr. 12:920 (1952).
27. Quittnier, H., Wald, N., Sussmann, L. N. and Antopol, W.: The effect of massive doses of cortisone on the peripheral blood and bone marrow of the mouse. Blood 6:513 (1951).
28. Randolph, T. G.: Differentiation and enumeration of eosinophils in the counting chamber with a glycol stain; a valuable technique in appraising ACTH dosage. J. Labor. a. Clin. Med. 34:1696 (1949).
29. Recant, L., Hume, D. M., Forsham, P. H. and Thorn, G. W.: Studies on the effect of pinephrine on the pituitary-adrenocortical system. J. Clin. Endocrinol. 10:187 (1950).
30. Reiss, M., Badrick, F. E., Halkerston, I. D. K. and Plaice, C.: Inactivation of adrenotropic hormone by plasma. Nature 168:206 (1951).
31. Renold, A. E., Forsham, P. H., Maisterrena, J. and Thorn, G. W.: Intravenously administered ACTH. New England J. Med. 244:796 (1951).
32. Rosenthal, R. L., Wald, N., Yager, A. and Litwing, J.: Effects of cortisone and ACTH therapy on eosinophils of the bone marrow and blood. Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. 75:740 (1950).
33. Rud, F.: The eosinophil count in health and in mental disease. Acta Psychiatrica et Neurol., Suppl. 40, Kopenhagen, 1947.
34. Ruppel, W. and Hitzelberger, A.: Kritisches zum Eosinophilen-Test. Schweiz. med. Wschr. 81:926 (1951).
35. Smith, R. W., Margulis, R. R., Brennan, M. J. and Monto, R. W.: The influence of ACTH and cortisone on certain factors of blood coagulation. Science 112:295 (1950).
36. Thorn, G. W., Forsham, P. H., Prunty, F. T. G. and Hills, A. G.: A test for adrenal cortical insufficiency. J. amer. med. Assoc. 137:1005 (1948).
37. Tronchetti, V. e Rossi, A.: Su la eosinofilia da ormone corticotropo. Folia endocrinol. 2:453 (1949).
38. Verstraete, M., Vandenbroucke, J. et Verwilghen, R.: L'influence de l'ACTH et de la Cortisone sur la Coagulation sanguine. Comptes rendus 3e congrès Soc. Int. europ. d'Hématologie Roma 1951, p. 710.
39. Weissbecker, L. und Hitzelberger, A.: Gibt es ein Regulationssystem ACTH-Heparin? Klin. Wschr. 31:288 (1953).
40. Weissbecker, L.: Klinik der Nebenniereninsuffizienz und ihre Grundlagen. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1954.
41. Zollikofer, H.: Einfluss kleiner Dosen von adrenocorticotropem Hormon auf Thrombocyten und Blutgerinnungsfaktoren. Diss. Zürich, 1950.

